

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO ASCÓRBICO (VITAMINA C) EN ZUMO NATURAL DE
Hilocereus spp (PITAHAYA) UTILIZANDO MÉTODO FLUOROMÉTRICO

TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD DIPLOMADO DE ESPECIALIZACIÓN

PRESENTADO POR:

GERSON ANTONIO CEDILLOS SANTOS

MARINA DEL CARMEN CHÁVEZ GÓMEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO(A) EN QUÍMICA Y FARMACIA

ENERO 2025

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO JUAN ROSA QUINTANILLA

SECRETARIO GENERAL

LICENCIADO PEDRO ROSALÍO ESCOBAR CASTANEDA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANA

MAESTRA NANCY ZULEYMA GONZÁLEZ SOSA

SECRETARIA

LICENCIADA EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCIÓN DE PROCESOS DE GRADO

DIRECTORA GENERAL (AD-HONOREM)

MAESTRA KATIA LISSETTE MARTÍNEZ DE PALACIOS

TRIBUNAL EVALUADOR

ASESORA DE ÁREA DE ANÁLISIS DE ALIMENTOS

MAESTRA DINORAH DEL CARMEN RODRÍGUEZ DE LAÍNEZ

ASESORA

LICENCIADA PATRICIA DEL ROSARIO ESCOBAR DE MURCIA

TUTORA

MAESTRA MARÍA DEL CARMEN POLÍO MARTÍNEZ

AGRADECIMIENTOS

A Dios Omnipotente, por habernos permitido llegar a la culminación de nuestra carrera dándonos las fuerzas, salud, sabiduría y el entendimiento necesario para poder lograrlo.

A todas las personas que desinteresadamente invirtieron parte de su tiempo y conocimiento para apoyarnos a realizar este trabajo.

A nuestro tutor maestra María del Carmen Polío Martínez, que estuvo a la disposición de guiarnos y nos brindó parte de su tiempo y conocimiento para desarrollar este trabajo.

A la Universidad de El Salvador en especial a la Facultad de Química y Farmacia, por permitirnos ser parte y habernos formado como profesionales.

Al personal docente de nuestra querida facultad, puesto que sin sus enseñanzas este triunfo no lo habríamos logrado.

DEDICATORIA

En primer lugar, a Dios todopoderoso por ser mi guía y fortaleza a lo largo de este camino, quien me dio sabiduría, perseverancia y paciencia para culminar esta etapa de mi vida. Nada de esto hubiese sido posible sin tu presencia en mi vida, te dedico todo mi esfuerzo con mucha humildad y agradecimiento.

A mi mamá Elva Santos quien, aunque ya no este físicamente a mi lado, su espíritu sigue presente en cada uno de mis logros y sigues siendo mi mayor inspiración, gracias a tu amor y sacrificio que me ha permitido llegar hasta aquí. Este logro es fruto de tus enseñanzas, apoyo incondicional y el ejemplo de lucha que me diste durante toda tu vida. Siempre estarás en mi corazón.

A mi hermano Ezequiel Cedillos y su esposa Sara Centeno, quienes siempre me brindaron su apoyo incondicional, sus constantes consejos y cariño me han acompañado en cada paso de este proceso. Les estoy infinitamente agradecido por estar siempre ahí.

A mi hermano Leví Cedillos y su esposa Elizabeth Orellana por sus invaluable consejos y por siempre estar dispuestos a ayudarme en los momentos más difíciles de este camino, gracias por brindarme su amor. Les estoy inmensamente agradecido por estar siempre ahí.

A mi familia tíos y primos que me brindaron su enorme apoyo, con cariño les doy las infinitas gracias por su ayuda.

A mis amigos y demás personas que estuvieron dándome palabras de aliento y motivación y me incentivaron a terminar mis estudios.

Gerson Antonio Cedillos Santos

DEDICATORIA

Agradezco y dedico este proyecto y toda mi carrera universitaria a:

Dios Todopoderoso por guiarme y estar presente en cada segundo de mi vida cuidándome y brindándome la salud, fortaleza y sabiduría necesaria para culminar este logro.

Mi madre, Gloria Gómez porque gracias a sus enseñanzas, consejos, sacrificio, apoyo, desvelos y sobre todo su amor incondicional soy quien soy hoy en día

Mi padre, Abraham Chávez por su apoyo y motivación brindada.

Mi esposo e hija, Ernesto y Camila Pérez, quienes son mi motivación, fuerza e inspiración para salir adelante cada día.

Mi hermana Lucía Chávez, quien me apoyó e inspiró y sirvió de ejemplo para alcanzar mis metas.

A mis hermanos, que siempre me han animado y apoyado.

A mi tía Maura Chávez, por permanecer al pendiente apoyándome y motivándome para culminar la carrera.

A mi suegra Marta Pérez, por el apoyo recibido. A todos les agradezco mucho.

Marina Del Carmen Chávez Gómez

INDICE GENERAL

	Pág N ^o
RESUMEN	
CAPÍTULO I	
1.0 INTRODUCCIÓN	14
CAPÍTULO II	
2.0 OBJETIVOS	17
CAPÍTULO III	
3.0 MARCO TEÓRICO	19
3.1 Vitaminas	19
3.2 Ácido ascórbico	19
3.2.1 Propiedades físicas y químicas	20
3.2.2 Función del ácido ascórbico en procesos metabólicos	20
3.2.3 Dosis de ácido ascórbico	21
3.2.4 Fuentes de obtención de ácido ascórbico	21
3.3 Generalidades de la pitahaya (<i>Hylocereus spp</i>)	22
3.3.1 Historia	22
3.3.2 Caracterización botánica	22
3.3.3 Especies más populares de pitahaya	23
3.3.4 Composición de la pitahaya	24
3.3.5 Usos de la pitahaya	26
3.4 Espectroscopía de fluorescencia	26
3.4.1 Componentes de los fluorómetros	28
3.4.1.1 Fuentes de luz de excitación	29
3.4.1.2 Selector de longitud de onda de excitación	29
3.4.1.3 Dispositivos de muestreo	30
3.4.1.4 Selector de longitud de onda de emisión	30
3.4.1.5 Detector	30
3.4.2 Factores que afectan la cuantificación	31

3.4.2.1 Factores basado en instrumentos	31
3.4.2.2 Factores basados en muestras	31
3.4.3 Aplicaciones de la fluorescencia	33
CAPÍTULO IV	
4.0 PRODUCTO FINAL	35
4.1 Introducción	35
4.2 Objetivos	36
4.3 Tipo de método de análisis y fundamento	36
4.4 Información general de la muestra	37
4.5 Reactivos	38
4.6 Materiales y equipo	38
4.7 Procedimiento de la práctica de determinación	39
4.7.1 Preparación de estándar de referencia	39
4.7.2 Procesamiento de la muestra de pitahaya	40
4.7.3 Determinación de la cantidad apreciable de sustancias básicas	40
4.7.4 Extracción y preparación de la solución de ensayo	41
4.7.5 Preparación de soluciones previo a determinación en el fluorómetro	42
4.7.6 Preparación de soluciones blanco	43
4.7.7 Determinación de la curva de calibración	43
4.7.8 Determinación de fluorescencia de la muestra	44
4.8 Cálculos involucrados	45
4.9 Normativas nacionales o internacionales	47
CAPÍTULO V	
5.0 CONCLUSIONES	49
CAPÍTULO VI	
6.0 RECOMENDACIONES	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

INDICE DE FIGURAS

Figura N ^o		Pág N ^o
1	Fruto maduro de las diferentes especies de pitahaya	24
2	Plantas de pitahaya en fructificación	26
3	Espectros de excitación y emisión de fluorescencia para fluoresceína en solución tampón de borato	27
4	Componentes de un fluorómetro	28
5	Fluorómetro	33
6	Formación del compuesto fluorescente	37
7	Fluorescencia vs μg de ácido ascórbico	44

INDICE DE TABLAS

Figura N ^o		Pág N ^o
1	Clasificación taxonómica de la Pitahaya (<i>Hylocereus spp.</i>)	23
2	Composición nutricional de 100 g de pulpa de dos especies de pitahaya	25
3	Datos obtenidos del análisis del estándar y muestra	45

INDICE DE ANEXOS

Figura N ⁰		Pág N ⁰
1	Norma para la pitahaya	58
2	Preparación de reactivos	60

RESUMEN

La falta de estudios sobre la cuantificación de ácido ascórbico en *Hylocereus spp* (Pitahaya), mediante técnicas poco complejas ha motivado la realización de esta investigación enfocada en la determinación de la cantidad de ácido ascórbico en el zumo de pitahaya mediante Fluorometría, un método analítico altamente específico y sensible para esta vitamina. El objetivo es cuantificar el ácido ascórbico presente en esta fruta, dada su importancia nutricional y creciente popularidad en El Salvador.

La información presentada incluye el tratamiento y preparación de muestras de pitahaya, con la extracción del ácido ascórbico a través de la oxidación a ácido deshidroascórbico, seguido de la adición de un marcador fluorogénico que permite la detección de fluorescencia. Esta técnica establece una relación entre la intensidad de la fluorescencia y la concentración de ácido ascórbico, siguiendo procedimientos basados en estudios anteriores y de la AOAC, con algunas modificaciones.

La cuantificación del ácido ascórbico en distintas especies de pitahaya sigue los lineamientos de la AOAC, proporcionando datos valiosos sobre el contenido de ácido ascórbico en esta fruta exótica. No se encontraron valores normativos a nivel nacional o internacional con los cuales comparar los resultados obtenidos, sin embargo, se proporcionan estudios con los cuales se puede hacer una comparación.

En conclusión, la metodología fluorométrica es eficiente y precisa para la determinación de ácido ascórbico en la pitahaya. Se recomienda continuar realizando estudios sobre esta fruta para estandarizar un rango de concentración de ácido ascórbico a nivel nacional, así como utilizar métodos comparativos con otras técnicas analíticas como HPLC o valoraciones redox.

CAPÍTULO I

1.0 INTRODUCCIÓN

El ácido ascórbico o Vitamina C, es una vitamina hidrosoluble que actúa como cofactor en diversas reacciones enzimáticas que tienen lugar en el organismo; los seres humanos, debido a su incapacidad para sintetizar el ácido ascórbico, por carecer de enzimas, dependen absolutamente de la ingesta diaria de este micronutriente, cuyas fuentes principales, son las frutas cítricas y las verduras frescas.

La pitahaya (*Hylocereus spp.*), conocida comúnmente como “fruta del dragón”, es un fruto originario de centroamérica y la selva peruana cuyo fruto puede ser de diferentes colores como amarillo, púrpura, rojo y blanco. Este fruto presenta un alto valor nutricional, destacando el contenido de ácido ascórbico que se encuentra entre 4 y 25 mg por 100 gramos según su especie.

En toda la revisión bibliográfica de esta investigación, se han encontrado muy pocos estudios que determinan ácido ascórbico en la pitahaya, y ningún estudio que implemente el método fluorométrico. La pitahaya por ser una fruta que ha ingresado recientemente a la gastronomía salvadoreña y por su disponibilidad la hacen una excelente matriz para esta investigación, además la determinación de ácido ascórbico en esta fruta es importante, porque nos permite inferir sobre el valor nutritivo del mismo.

La determinación analítica cuantitativa de ácido ascórbico en este tipo de matriz por ser muestras coloreadas no es muy factible realizarlas por diferentes métodos o análisis volumétrico que se fundamentan en utilizar agentes que nos indican el punto de equivalencia por un viraje del color. Sin embargo, uno de los métodos más específicos para la determinación de ácido ascórbico y su producto de oxidación biológicamente activo, es el método fluorométrico, siendo un método poco utilizado y que es oficial de la AOAC.

Por estas razones el presente trabajo plantea la utilización de una técnica analítica basada en fluorimetría, Además se proporciona un método de pretratamiento de la fruta para la extracción y estabilización de ácido ascórbico.

El método propuesto detecta el ácido ascórbico mediante la oxidación de este, convirtiéndose en ácido deshidroascórbico, luego se añade un marcador fluorogénico para producir un derivado de quinoxalina fluorescente, obteniéndose una relación entre intensidad de fluorescencia y la concentración de ácido ascórbico. Antes se hace una preparación de la muestra que requiere la maceración y estabilización con ácido meta fosfórico. En la metodología propuesta se han realizado ciertas modificaciones obtenidas de un estudio con un método mejorado y automatizado.

En la búsqueda bibliográfica que se realizó para este trabajo, no se encontró ninguna referencia normativa tanto nacional como internacional, que nos pueda servir de parámetro para comparar la cantidad de ácido ascórbico en la pitahaya, sin embargo, en el estudio “Pitahaya (*Hylocereus spp.*): Cultivo, características fisicoquímicas, composición nutricional y compuestos bioactivos” se encuentra una tabla de referencia de todas las especies de pitahaya, con la cual se puede realizar una comparación.

CAPÍTULO II

2.0 OBJETIVOS

2.0. OBJETIVO GENERAL

Cuantificar el ácido ascórbico (Vitamina C) en zumo natural de *Hylocereus spp* (Pitahaya) utilizando el método fluorométrico.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1.1. Describir el fundamento de la fluorimetría y su aplicabilidad en la cuantificación de ácido ascórbico.

2.1.2. Proporcionar un método de pre-tratamiento de la muestra para la extracción y estabilización de ácido ascórbico.

2.1.3. Detallar el procedimiento de preparación de muestra y estándar para la medición de ácido ascórbico por fluorimetría y establecer la curva de calibración.

2.1.4. Plantear los cálculos para determinar la cantidad de ácido ascórbico en pitahaya, por interpolación de la curva de calibración o basados en la fórmula propuesta por la AOAC.

CAPÍTULO III

3.0. MARCO TEÓRICO

3.1. Vitaminas

Son sustancias orgánicas, biológicamente activas, presentes en los alimentos naturales que no pueden ser sintetizadas por el organismo humano en cantidades adecuadas y que se requieren en pequeñas cantidades para el mantenimiento de las funciones metabólicas de la mayoría de las células animales. Razón por la cual son llamados micronutrientes ya que solo se necesitan en la dieta humana en cantidad de miligramos o microgramos por día, a diferencia de carbohidratos, proteínas y grasas que son macronutrientes.¹

3.2. Ácido ascórbico

3.2.1. Propiedades físicas y químicas

Es un compuesto blanco, cristalino o levemente amarillo, inodoro que se oscurece de manera gradual en su exposición con la luz. Estando seco, es estable al aire, pero en solución se deteriora con rapidez en presencia de aire. En la naturaleza se puede encontrar en su forma reducida y en su forma oxidada. Tiene un punto de fusión de alrededor de 190°C. Es soluble en 1 gramo por 3 mililitros de agua o 40 mililitros de alcohol, insoluble en cloroformo, éter o benceno.²

Los nombres químicos de la vitamina C son ácido ascórbico y ascorbato. Es una lactona de seis carbonos la cual se sintetiza a partir de la glucosa en muchos animales. Cuando no hay suficiente vitamina C en la dieta, los humanos sufren una enfermedad potencialmente letal llamada escorbuto.³

El ácido ascórbico tiene un carbono con actividad óptica y la acción contra el escorbuto reside en la acción del isómero L. Los humanos y los primates carecen de la enzima terminal en el ciclo del ácido ascórbico, 1-gluconolactona oxidasa, porque el gen que la produce ha sufrido una mutación sustancial, por lo tanto, no se produce ninguna proteína.²

3.2.2. Función del ácido ascórbico en procesos metabólicos

La vitamina C o ácido ascórbico (AA) es el principal antioxidante no enzimático hidrosoluble presente en el plasma, donde se encuentra predominantemente en la forma de anión ascorbato (AA⁻) y en menor medida, como radical ascorbilo (AA^{·-}) y anión deshidroascorbato (DHA⁻). Estas dos últimas moléculas se generan por dos oxidaciones consecutivas reversibles del anión ascorbato.⁴

La mayoría de los mamíferos sintetizan AA en el hígado a partir de la glucosa; sin embargo, los humanos, cuyes, primates y ciertos murciélagos carecen de esta capacidad, ya que no poseen la enzima que cataliza el paso final de su biosíntesis (L-gulono-lactona oxidasa) y deben adquirirlo desde la dieta. El AA⁻ es estable a pH ácido, sin embargo, se oxida a pH básico o neutro y en presencia de oxígeno o metales pesados como hierro y cobre, generando AA^{·-} al recibir un electrón, y DHA⁻ al recibir un segundo electrón.⁴

La vitamina C es necesaria para la síntesis de colágeno, un importante componente estructural de los vasos sanguíneos, tendones, ligamentos, y huesos. La vitamina C, también desempeña un papel importante en la síntesis de los neurotransmisores, la norepinefrina. Los neurotransmisores son fundamentales para la función cerebral y se sabe que afectan el estado de ánimo. Además, la vitamina C es necesaria para la síntesis de carnitina, una pequeña molécula que es esencial para el transporte de grasa a orgánulos.²

3.2.3. Dosis de ácido ascórbico

Actualmente, la ingesta diaria recomendada (IDR) de vitamina C varía ligeramente entre países, definiéndose distintas recomendaciones según grupo etario, sexo y pertenencia a un grupo de riesgo (consumidor de tabaco y/o alcohol, adulto mayor institucionalizado, etc.). En Estado Unidos, por ejemplo, la IDR es de 90 mg/día en hombres y 75 mg/día en mujeres.⁴

Este micronutriente cuando se administra como un suplemento nutricional por vía oral es de 50-100 mg al día; pero cuando se trata de una carencia o deficiencia debe ser administrado 100-250 mg por día; sin embargo, en metahemoglobinemia, la dosis oral es 300-600 mg al día en dosis divididas. Por otro lado, la dosis en población pediátrica como suplemento nutricional es 20- 50 mg por día, pero como tratamiento en deficiencia es 100-300 mg por día.⁵

3.2.4. Fuentes de obtención del ácido ascórbico

El ácido ascórbico se encuentra principalmente en alimentos frescos de origen vegetal (frutas y hortalizas) y, en menor medida, alimentos de origen animal. Entre los alimentos de origen vegetal como los cítricos (naranjas, limones y limas), kiwi, fresas, brócoli y lechuga, que son fuente natural de ácido ascórbico, y de origen animal como hígado, leche y productos lácteos, etc.⁶

La cantidad de ácido ascórbico se encuentra en niveles máximos en frutas y vegetales maduros, entre los frutos con mayor contenido de ácido ascórbico, está la ciruela kakadu, el camu camu y la rosa mosqueta.⁴ Sin embargo estos alimentos no son comúnmente consumidos en El Salvador, porque no se producen o no forman parte de nuestra cultura culinaria. Una de las frutas que presentan mayores concentraciones de vitamina C y es una fruta que ha ingresado recientemente a la gastronomía salvadoreña es la pitahaya.⁷

3.3. Generalidades de la pitahaya (*Hylocereus spp.*)

3.3.1. Historia

La Pitahaya (*Hylocereus spp.*) es originaria de México y cultivada en algunos países tropicales y subtropicales, como Taiwán, el sur de China, Israel, Tailandia, Australia, Estados Unidos de América y Malasia. La fruta se cultiva en gran medida en Vietnam, conocido localmente como “Thanh Long” o “el dragón verde”, una descripción asociada con el color verde de la fruta inmadura y la aparición de dragón de las escalas o los soportes de los frutos.⁷

Este fruto fue domesticado originalmente por las culturas pre-colombinas, quienes lo recolectaban silvestremente para su alimentación y medicina, pero aún era desconocido para muchos. Fue hasta mediados de la década de 1990 que ésta súper fruta tomó realce. Actualmente la pitahaya, es ahora un fruto exótico muy conocido, atractivo por su forma y color, además por sus novedosas propiedades nutricionales que capta la atención del sector alimentario y comercial. Adicionalmente es una planta ornamental de floración nocturna y como cultivo de frutas. Su nombre significa "fruta escamosa" y se refiere tanto a la planta de pitahaya como a su fruto.⁷

La pitahaya es nativa de América Central y del Sur y se cultivan comercialmente en una amplia gama de países, incluidos México, Nicaragua, Guatemala, Estados Unidos, Taiwán, Vietnam, Filipinas e Israel. La pitahaya es una especie de cultivo en dispersión en el trópico y subtrópico que presenta alto polimorfismo. La especie ha sufrido selección humana por acción de colecta de frutos, situación que promovió la diversidad de frutos en forma, tamaño, color y calidad organoléptica, por lo tanto, hoy en día se conocen más de una especie de pitahaya.⁷

3.3.2. Caracterización botánica

La clasificación botánica de esta familia es muy complicada, en vista de que numerosas especies mantienen características morfológicas semejantes, denominándose genéricamente “pitahaya” a

todas estas variedades. Son cuatro los géneros que sobresalen de esta especie los cuales son *Cereus spp.*, *Hylocereus spp.*, *Selenicereus spp.*, *Stenocereus spp.*.⁸ Sin embargo, prevalece en dos géneros separados, "*Hylocereus*" y "*Selenicereus*". Las variedades cultivadas comercialmente más comunes son del género *Hylocereus* que cubre alrededor de 16 especies diferentes. Siendo el género *Hylocereus* el enfocado en este estudio.⁷

Tabla N°1 Clasificación taxonómica de la Pitahaya (*Hylocereus spp.*)⁷

Nombre científico	<i>Hylocereus spp.</i>
Reino	Plantae
División	Magnoliophita
Clase	Magnoliopsida
Orden	Caryophyllale
Familia	Cactaceae-cactácea
Tribu	Hylocereeae
Genero	Hylocereus
Especie	<i>H. extensus</i> (Salm-Dyck ex De Candolle) <i>H. staceus</i> (Salm-Dyck ex De Candolle) <i>H. tricae</i> (Hut) <i>H. minutiflorus</i> Br. And <i>H. megalanthus</i> (Schum ex Vaupel) <i>H. stenopterus</i> (Wber) Br. And <i>H. calcaratus</i> (weber) Br. And R. <i>H undatus</i> (Haw) BR. And R. <i>H escuitiensis</i> (Kimm) <i>H. ocamponis</i> (Salm-Dyck) Br. And R. <i>H. guatemalensis</i> (Eich). And R. <i>H. purpusii</i> <i>H. costaricensis</i> (Weber) Br. And R. <i>H. trinogus</i> (Haw). Safford <i>H. triangularis</i> (L.) Br. R. <i>H. monocanthus</i> .

3.3.1. Especies más populares de pitahaya

Hylocereus undatus tiene flores largas de hasta 29 cm, de color verde o amarillo verdoso y el interior segmentos de perianto blanco puro. Su fruto es de piel rojo-rosa y pulpa blanca, cubierto por bractéolos rojos y verdes en las puntas. La especie *Hylocereus megalanthus* tiene flores blancas

muy largas de 32 - 38 cm de largo, medida superior al de otras especies. Su fruto se caracteriza por tener una corteza color amarillo con espinas y pulpa blanca jugosa. *Hylocereus monacanthus* posee flores de 25 a 30 cm de largo, con segmentos periantio rojizos externos, especialmente en las puntas y amarillentos lóbulos de estigma. Su fruto posee cascara roja con brácteolos sobresalientes verdes y pulpa roja brillante, con pequeñas semillas negras. Su fruto escarlata mide de 10 – 12 cm de diámetro.⁷



Figura N°1 Fruto maduro de las diferentes especies de pitahaya.^{7,9}

3.3.2. Composición de la pitahaya

La pitahaya está compuesta de pulpa y cascara, su pulpa es consistente y espumosa, presenta coloración blanca (variedad amarilla) y blanca rojiza (variedad roja), con pequeñas y suaves pepas comestibles, cubiertas de escamas rojas y amarillas según la especie. La pulpa de la Pitahaya (*Hylocereus*) representa entre el 60-80 % de su peso total, el cual varía en promedio de 200-570 g, según su especie. Sin embargo, es considerado que la Pitahaya sufre cambios físicos durante su maduración. En una evaluación a *H. Megalanthus* (Pitahaya amarilla) se obtuvo, que el porcentaje de cascara disminuyó de 55.93 a 33.40 %; mientras que el de pulpa aumentó de 44.04 a 66.60 % entre el estado de madurez de 0 a 6, respectivamente.⁹

La Pitahaya es un fruto de bajo valor calórico, ya que cuenta con pequeñas cantidades de hidratos de carbono (9,20 g por cada 100 g de pulpa comestible). En su composición destaca el contenido

de vitamina C. En la Tabla N° 2, se observa la composición nutricional de dos especies de pitahaya, donde la variedad roja (*Hylocereus undatus*) resalta en su composición de vitamina C desde el punto de vista funcional con relación a la variedad de color amarilla (*Hylocereus megalanthus*).⁹

Tabla N°2. Composición nutricional de 100 g de pulpa de dos especies de pitahaya.⁹

Componente	<i>Hylocereus undatus</i> (pulpa blanca y piel rosa)			<i>Hylocereus megalanthus</i> (pulpa blanca y piel amarilla)		
	Mercado-Silva (2018)	ICBF (2018)	Morales de León <i>et al.</i> (2015)	Mercado-Silva (2018)	ICBF (2018)	Morales de León <i>et al.</i> (2015)
Agua (%)	89	87,3	82,3	85	85,5	85,9
Proteína (g)	0,5	0,5	1,4	0,4	0,4	1,1
Grasa (g)	0,1	0,1	*	0,1	0,1	*
Carbohidrato (g)	NE	11,6	13,55	NE	13,6	9,8
Fibra Dietética(g)	0,3	3,3	NE	0,5	3,3	NE
Vitamina C (mg)	25,0	25,0	25,8	4	20,0	7,34
Calcio (mg)	6,0	26,0	5,0	10,0	26,0	8,26
Hierro (mg)	0,4	0,2	0,75	0,3	0,3	*
Fosforo (mg)	19,0	26,0	15,0	16,0	26,0	*
Tiamina (mg)	0,01	0,01	*	0	0,03	*
Riboflavina (mg)	0,03	0,03	*	0	0,04	*
Niacina (mg)	0,2	0,2	0,37	0,2	0,2	*
Ceniza (g)	0,5	0,5	0,50	0,4	0,4	0,60

* valor no encontrado; N: Valor no evaluado.

El sabor de este fruto depende de la madurez durante su cosecha, factor importante para que la concentración de azúcares sea mayor y de esta manera aumente los sólidos solubles totales (SST) expresados en grados Brix. Los SST que predominan en la pitahaya son la glucosa y fructosa. Azúcares que por su concentración identifican a cada una de las variedades de pitahaya. En el campo de la gastronomía los tallos de la Pitahaya son utilizados por su característica consistencia suave y su contenido nutrimental.

En un estudio de su composición se observó contenido de proteína cruda de 11,8-24,49 g y de fibra cruda de 7,86-14,79 g con contenido de cenizas entre 10,80 a 14,90 g y extracto etéreo 0,64 a 1,46 g, obtenidos mediante un análisis proximal y expresado en base seca (g/100 g de materia seca). Además, la variedad de pitahaya *Hylocereus undatus* tiene importantes contenidos de Zn (34,02 mg kg⁻¹) y K (4,82 mg kg⁻¹). En la especie *Hylocereus megalanthus* (Pitahaya amarilla), se ha encontrado que el aceite de su semilla presenta alto contenido de ácidos linoleicos grasos poliinsaturados. Los cinco principales ácidos grasos encontrados fueron: ácido palmítico (11,52%),

ácido esteárico (4,29%), ácido oleico (11,09%), ácido vaccénico (3,08%), y ácido linoleico (69,98%).⁹



Figura N°2 Plantas de pitahaya en fructificación.^{7,8}

3.3.3. Usos de la pitahaya.

De manera popular la gente del área rural la utiliza para combatir las enfermedades infecciosas de las vías urinarias. También se utiliza como estimulante nervioso, laxante suave y contra los cálculos renales. El uso principal de la pitahaya es alimenticio, sobre todo el fruto, aunque también se informa el consumo de las flores como legumbre y el de los brotes tiernos como hortaliza fresca. Las semillas son empleadas como probióticos, por su contenido de oligosacáridos, las cuales pueden constituir un ingrediente importante en alimentos funcionales y productos nutracéuticos. La fruta es blanda y de sabor agradable y se come fresca o se utiliza en la preparación de refrescos, sorbetes, jaleas, mermeladas y dulces.⁷

3.4. Espectroscopia de fluorescencia

La fluorescencia es la propiedad de ciertas moléculas orgánicas e inorgánicas de liberar energía en forma de luz cuando son excitadas por una fuente de alta energía, la cual eleva los niveles de energía de los electrones dentro de la molécula. La fluorescencia es un proceso de dos pasos que requiere

la absorción de luz a una longitud de onda específica (excitación) seguida de la emisión de luz, generalmente a una longitud de onda más alta. La emisión de luz se denomina fluorescencia. El tipo más común de muestra fluorescente es una solución transparente submicromolar que absorbe la luz siguiendo la ley de Beer-Lambert-Bouguer y emite fluorescencia de la especie fluorescente o fluoróforo.¹⁰

Los métodos de fluorescencia también se denominan sin fondo porque llega poca luz de excitación al detector. Esta característica hace que la detección de fluorescencia sea muy sensible, incluso en algunos casos, la detección de moléculas individuales. La detección de fluorescencia también puede ser muy específica porque un fluoróforo emite un patrón de emisión característico. La especificidad y la sensibilidad son dos de los puntos fuertes más importantes de los métodos de fluorescencia.¹⁰

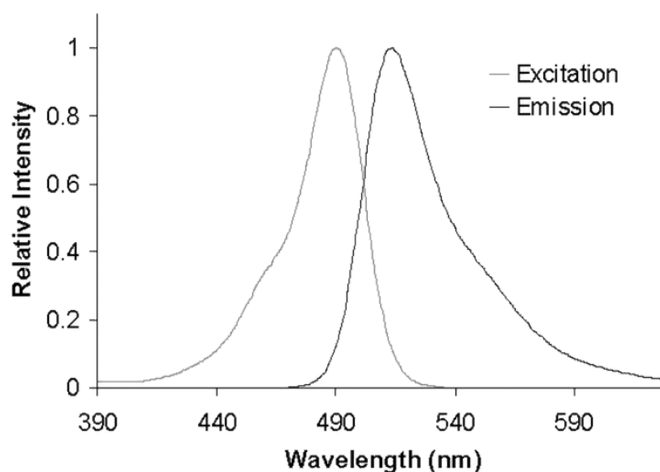


Figura N°3 Espectros de excitación y emisión de fluorescencia para fluoresceína en solución tampón de borato.¹⁰

3.4.1. Componentes de los fluorómetros

Los componentes de un fluorómetro o espectro fluorómetro son muy similares a los de un espectrómetro Visible- UV. Un diagrama simplificado de los componentes de un fluorómetro son los que aparecen en la Figura 4.¹¹

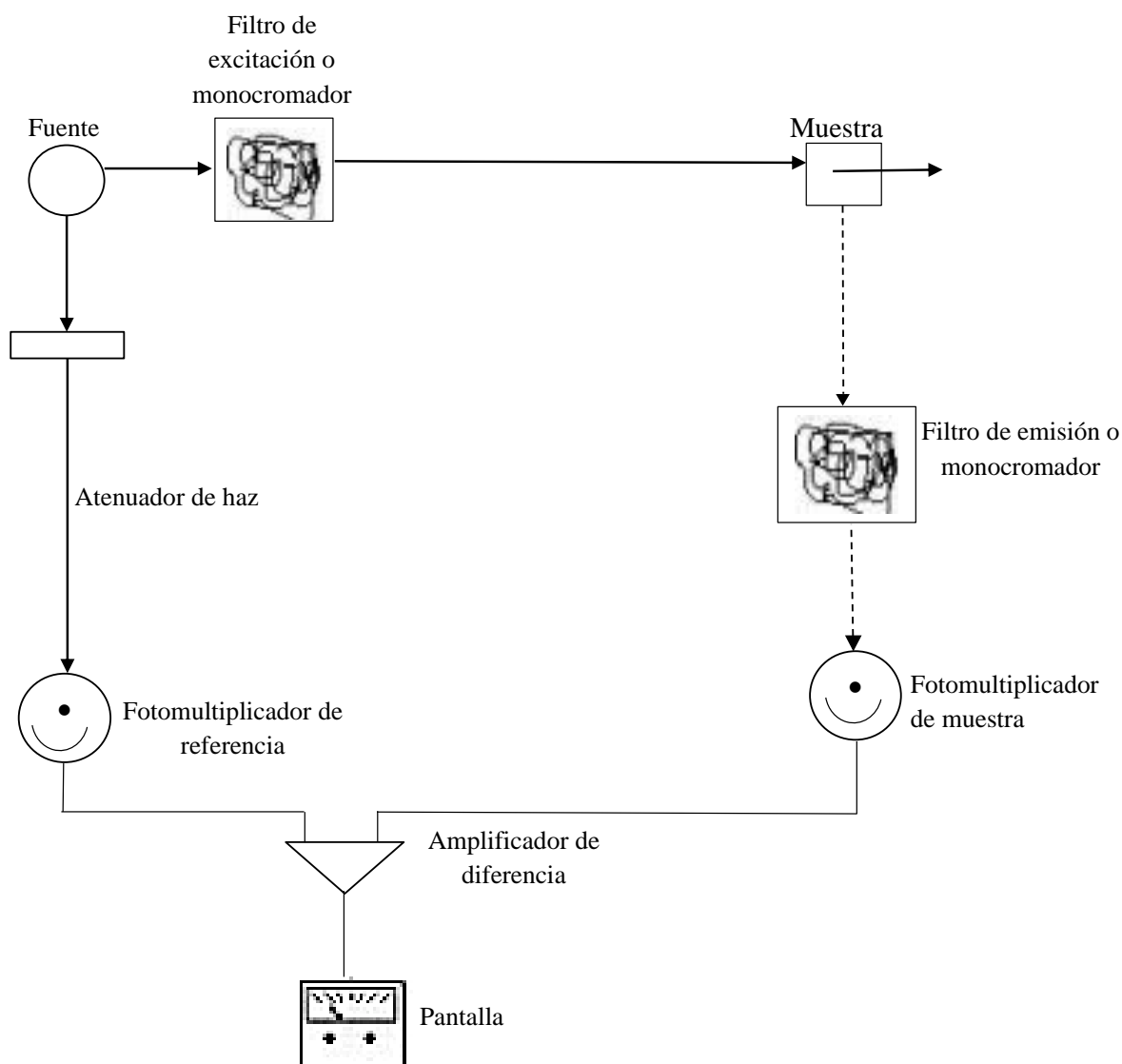


Figura N°4 Componentes de un fluorómetro.¹¹

Todas las mediciones de fluorescencia modernas implican la irradiación de la muestra con el haz de una fuente de luz adecuada, la selección de la longitud de onda de excitación, la recolección de la fluorescencia resultante, el rechazo de la luz dispersada por Rayleigh, la selección de la longitud de onda de emisión y la detección de la señal de fluorescencia. Las siguientes funciones se analizarán individualmente, junto con el equipo utilizado para lograr estas funciones en los instrumentos comerciales:¹⁰

- Fuente de luz de excitación
- Selector de longitud de onda de excitación
- Dispositivo de muestreo
- Selector de longitud de onda de emisión
- Detector.

3.4.1.1. Fuente de luz de excitación

Se utilizan diversas lámparas, láseres y diodos emisores de luz (LED) como fuentes de excitación. Las versiones continuas y pulsadas de estas fuentes se utilizan para instrumentos de estado estable y de resolución temporal, respectivamente. Las lámparas de xenón son las más utilizadas debido a su intensidad relativamente alta y su amplio rango de longitudes de onda (UV a NIR). Los láseres son las fuentes de mayor intensidad y se utilizan en aplicaciones en las que se requieren tiempos de recolección cortos y pequeñas cantidades de muestra, por ejemplo, para citometría de flujo o microarrays.¹⁰

3.4.1.2. Selector de longitud de onda de excitación

La intensidad de la luz dispersada en la longitud de onda de excitación (es decir, dispersión de Rayleigh) puede ser comparable o mayor que la de la fluorescencia en la muestra. Por lo tanto, el perfil de longitud de onda de excitación no debe superponerse a la región de longitud de onda de emisión que se está detectando. Esto se logra para las lámparas utilizando un selector de longitud

de onda de excitación (por ejemplo, un filtro o un monocromador con una longitud de onda de transmisión máxima y un ancho de banda conocidos) entre la lámpara y la muestra. El ancho de banda inherente de la radiación de un láser o un LED a menudo es lo suficientemente estrecho como para que no sea necesario un selector de longitud de onda de excitación. Este selector también permite resolver los espectros de excitación de fluorescencia.¹⁰

3.4.1.3. Dispositivo de muestreo

El dispositivo de muestreo incluye todos los elementos ópticos y otros equipos necesarios para enviar el haz de excitación a la muestra, recolectar la emisión de la muestra y mantener la muestra en su lugar. Los formatos de muestra incluyen cubetas, placas de micropocillos, microarrays, portaobjetos de microscopio y sistemas de flujo, y pueden estar acompañados por una variedad de sistemas ópticos de entrega y recolección, incluidos sistemas de transmisión convencionales, frontales y de epifluorescencia y sondas basadas en fibra óptica.¹⁰

3.4.1.4. Selector de longitud de onda de emisión

Al igual que el selector de excitación, el selector de longitud de onda de emisión ayuda a garantizar que la región de longitud de onda de emisión que se detecta no se superponga con el perfil de longitud de onda de excitación. Este enfoque permite detectar bandas de fluorescencia individuales cuando hay varias bandas presentes y permite resolver los espectros de emisión de fluorescencia. Los selectores de longitud de onda de emisión también son importantes para el rechazo de la luz parásita. A menudo se utilizan filtros, monocromadores y policromadores de rejilla para la selección de longitud de onda de emisión.¹⁰

3.4.1.5. Detector

Para detectar la luz emitida, se coloca un tubo fotomultiplicador (PMT) o un dispositivo acoplado a carga (CCD) después del selector de longitud de onda de emisión. La detección del haz de

excitación para controlar su intensidad se realiza habitualmente mediante un detector de contador cuántico o un fotodiodo colocado antes de la muestra y al que se le separa una pequeña fracción del haz de excitación del resto.¹⁰

3.4.2. Factores que afectan la cuantificación.

3.2.2.1. Factores basados en instrumentos

Las mediciones en un instrumento de fluorescencia requieren que se configuren parámetros del instrumento como longitudes de onda, anchos de banda y ganancia del detector. Todos estos parámetros se pueden configurar con distintos grados de repetibilidad y precisión, según el instrumento utilizado. La intensidad del haz de excitación puede cambiar significativamente con la longitud de onda de excitación o con el tiempo debido a la dependencia de la longitud de onda de la intensidad de la fuente de luz y la transmitancia del selector de longitud de onda de excitación o la dependencia del tiempo de la intensidad de la fuente de luz. Por lo tanto, los analistas deben monitorear la intensidad del haz de excitación y corregir la intensidad de fluorescencia medida para estas fluctuaciones.¹⁰

La capacidad de respuesta de un sistema de detección no es lineal con la intensidad en todas las intensidades, por lo que los analistas deben conocer el rango de intensidad lineal del sistema de detección utilizado. La capacidad de respuesta del sistema de detección también es resultado de la dependencia de la longitud de onda de la transmitancia del selector de longitud de onda de emisión y de la capacidad de respuesta del detector. Estos factores pueden afectar la forma de un espectro de emisión medido.¹⁰

3.4.2.2. Factores basados en muestras

La intensidad de fluorescencia de muestras ópticamente densas (por ejemplo, absorbancia mayor a 0,05 a una longitud de trayectoria de 1 cm) no aumenta linealmente con la concentración debido a

la absorción significativa del haz de excitación y/o la emisión (reabsorción) por parte de la muestra. La intensidad de fluorescencia puede llegar a depender en gran medida de la posición de la muestra y la geometría óptica. En concentraciones incluso más altas, a menudo se produce la agregación de fluoróforos, lo que hace que la forma del espectro de fluorescencia sea diferente de la de una muestra diluida y también causa un comportamiento de concentración no lineal.¹⁰

La intensidad de fluorescencia de una muestra puede disminuir con el tiempo de exposición a la luz debido al fotoblanqueo y la fotodegradación. Los analistas deben limitar el tiempo de exposición de dichas muestras a la luz para obtener intensidades de fluorescencia reproducibles y, en algunos casos, incluso formas espectrales reproducibles. La intensidad de fluorescencia de los fluoróforos depende de la temperatura. Normalmente, las tasas de extinción de la fluorescencia, como la extinción por colisión en soluciones, aumentan con la temperatura y provocan una disminución de la intensidad de la fluorescencia.¹⁰

La intensidad de fluorescencia y la posición de pico de un fluoróforo, y a veces incluso su forma espectral, dependen a menudo del entorno, incluidos los cambios provocados por el disolvente utilizado, el pH de la solución o las especies a las que está unido el fluoróforo. Por las razones antes mencionadas, se debe tener cuidado durante el diseño experimental de una nueva metodología para considerar y evaluar estos efectos, y hacer coincidir la matriz con la referencia y la incógnita según corresponda.¹⁰



Figura N°5 Fluorómetro.¹¹

3.4.3. Aplicaciones de la fluorescencia.

Hoy día la fluorescencia es de primordial importancia en la química analítica. Una de sus más espectaculares aplicaciones ha sido en la detección y cuantificación de sustancias que son separadas a través del uso de la cromatografía de líquidos. Por otro lado, especies inorgánicas que son difíciles de detectar y cuantificar por espectroscopia UV-Visible o por Absorción Atómica se utilizan por fluorescencia. Adicionalmente a esto los niveles de detección son del orden de partes por billón, cantidades que por otras técnicas son difíciles de detectar. Estas entre otras son las razones de la importancia creciente de la fluorescencia. Sin duda alguna las aplicaciones más importantes en la fluorimetría son en análisis de alimentos, de productos farmacéuticos, de productos naturales y en análisis clínicos.¹¹

CAPÍTULO IV

4.0. PRODUCTO FINAL

Cuantificación del Ácido Ascórbico (Vitamina C) en zumo natural de *Hylocereus spp* (Pitahaya) utilizando método Fluorométrico.

4.1. Introducción

La vitamina C o ácido ascórbico (AA), es una vitamina hidrosoluble que actúa como cofactor en diversas reacciones enzimáticas que tienen lugar en el organismo¹², los seres humanos debido a su incapacidad para sintetizar el AA, por carecer de enzimas, dependen absolutamente de la ingesta diaria de este micronutriente⁵, cuyas fuentes principales, son las frutas cítricas y las verduras frescas. La dosis dietética recomendada es de 90 mg/día para adultos hombres y de 75mg/día para mujeres adultas¹³.

La pitahaya (*Hylocereus spp.*) conocida comúnmente como “fruta del dragón”, es un fruto originario de Centroamérica y la selva peruana cuyo fruto puede ser de diferentes colores como amarillo, púrpura, rojo y blanco. Este fruto presenta un alto valor nutricional, destacando el contenido de ácido ascórbico que se encuentra entre 4 y 25 mg por 100 gramos según su especie.⁹ Fruta que por su disponibilidad de cosecha la hace una excelente matriz alimentaria de investigación.

La determinación analítica cuantitativa de AA en este tipo de matriz por ser muestras coloreadas no es muy factible realizarlas por un análisis volumétrico que se fundamentan en utilizar agentes que nos indican el punto de equivalencia por un viraje del color¹⁴. Sin embargo, uno de los métodos más específicos para determinar AA y su producto de oxidación biológicamente activo, es el método fluorométrico introducido por Deutsch y Weeks, que es un método oficial de la AOAC.^{16,17}.

Dicho método detecta el AA mediante la oxidación de éste, convirtiéndose en ácido deshidroascórbico (ADA), luego se añade un marcador fluorogénico para producir un derivado de quinoxalina fluorescente, obteniéndose una relación entre intensidad de fluorescencia y la concentración de ácido ascórbico¹². En la metodología propuesta se han realizado ciertas modificaciones obtenidas de un estudio con un método mejorado y más automatizado.¹⁸

4.2. Objetivos

- Determinar el contenido de ácido ascórbico en el zumo de pitahaya (*Hylocereus spp*) mediante fluorimetría.

-Calcular la cantidad de ácido ascórbico en microgramos, por medio de la interpolación en la curva de calibración del estándar.

4.3. Tipo de método de análisis y fundamento:

-Método de análisis espectroscópico (fluorométrico). Se fundamenta en que la determinación de ácido ascórbico (AA) requiere su oxidación a ácido dehidroascórbico (ADA) luego se añade O-fenilenediamina (PDA) (marcador fluorogénico) a la solución de muestra para producir un derivado de quinoxalina fluorescente que presenta $\lambda_{\text{Excitación}} = 350 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{Emisión}} = 430 \text{ nm}$. Se mide la intensidad de fluorescencia formada mediante un fluorímetro, obteniendo la relación entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de vitamina C.^{12,14}

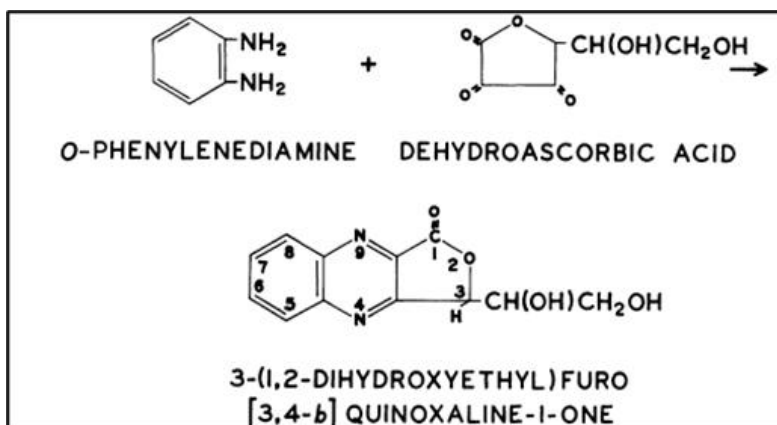


Figura N°6. Formación del compuesto fluorescente¹⁶

4.4. Información general de la muestra:

La pulpa de pitahaya contiene compuestos fenólicos, azúcares, saponinas, flavonoides, alcaloides, quinonas, compuestos grasos, calcio, hierro, fósforo, agua y fibra dietética.⁹ Los compuestos fenólicos podrían interferir en el análisis, sin embargo, se determina con la adición al blanco de ácido bórico - acetato de sodio y se corrige.¹⁶

Esta metodología está diseñada para aplicarse a todas las especies, por el tipo de matriz se realiza un muestreo al azar y que cumpla con los requisitos mínimos según norma para la pitahaya (CODEX STAN 237-2003) ver anexo N° 1. Se recomienda almacenar los frutos de pitahaya a temperaturas menores de 14 °C, para prolongar su corta vida útil, ya que este fruto cuando es almacenado a temperaturas superiores a 20 °C presenta pérdida de azúcar, pérdida de acidez y un ablandamiento rápido¹⁵. Manteniendo así todos los nutrientes presentes en la fruta en su mejor estado. Los componentes presentes en la matriz alimentaria estudiada (pitahaya) son los siguientes: agua, proteína, grasa, carbohidratos, fibra dietética, Vitamina C, Calcio, Hierro, Fósforo, Tiamina, Riboflavina, Niacina.

4.5. Reactivos:

- Hipoclorito de sodio 5% (Lejía).
- Solución estándar de ácido ascórbico (100, 80, 60, 40 y 20 μg / mL).
- Solución de extracción ácido metafosfórico - ácido acético (A).
- Solución de extracción ácido metafosfórico - ácido acético - ácido sulfúrico (B).
- Azul de timol (indicador de pH).
- N- Bromosuccinimida 0.5% (NBS).
- Solución de acetato de sodio 50%.
- Solución de O-fenilenediamina.

Ver anexo N° 2 para la preparación de los reactivos.

4.6. Materiales y equipo:

- Balanza semi-analítica
- Balanza analítica
- Fluorómetro
- Vortex
- Canasta para recolección del fruto
- Papel tolla
- Piseta o frasco lavador
- Papel Whatman No 12
- Goteros,
- Vidrio reloj
- Agitador de vidrio
- Cuchillo de acero inoxidable
- Colador de acero inoxidable
- Mortero y pistilo
- Beaker 25, 50 mL

- Pipeta morh de 10 mL
- Pipeta volumétrica 2, 5 y 10 mL
- Matraz erlenmeyer de 25 y 50 mL
- Balones volumétricos de 10, 25, 100 mL
- Probetas de 100 mL
- Tubos de ensayo
- Agitador magnético.

4.7. Procedimiento de la práctica de determinación

4.7.1. Preparación del estándar de referencia

- Solución madre (1 mg/mL): Pesar con precisión 50 mg de AA estándar de referencia USP, transferir a un balón volumétrico de 50 mL. Diluir a volumen inmediatamente antes de utilizar con solución de extracción A (ácido metafosfórico - ácido acético), guardar para hacer las demás soluciones.

- Solución 100 µg/mL: Tomar 10 mL de la solución madre agregarla a un balón volumétrico de 100 mL y llevar a volumen con la solución de extracción A.

- Para preparar las soluciones de 80, 60, 40 y 20 µg/mL, tomar 8.0, 6.0, 4.0 y 2.0 mL de la solución madre y proceder como en el paso anterior.

50 mg de AA _____ 50 mL [1 mg/mL]

|
10 mL _____ 100 mL

[0.1 mg/mL] = [100 µg/mL]

4.7.2. Procesamiento de la muestra de pitahaya (cualquier especie)

- Recepción y selección: Se recibe la matriz (pitahaya) que se utilizará para el análisis, se selecciona y se descarta la fruta con cualquier signo de plaga o daños causados por el transporte.

-Lavado: Se hace un lavado de la fruta seleccionada con hipoclorito de sodio al 5% (Lejía) y abundante agua, con el fin de eliminar impurezas o fuentes de contaminación que puedan interferir en el análisis. Secar la fruta con ayuda de papel toalla para llevarla a pesar.

- Pesado del fruto: Se realiza para determinar la cantidad con la cual se trabajará, haciendo uso de una balanza semi-analítica, esto con la finalidad de poder establecer la cantidad neta de vitamina C que puede contener el fruto completo.

- Pelado y cortado: Para realizar el pelado de la fruta se hará manualmente con el uso de un cuchillo de acero inoxidable, la pulpa se corta en rodajas finas y la cascará se descarta ya que no se tomará en cuenta para el análisis.

El siguiente método de análisis se obtuvo del propuesto por la AOAC¹⁷, Deutsch MJ, Weeks CE¹⁶ con ciertas modificaciones obtenidas de un método automatizado propuesto por Roy R, Conetta A, Salpeter J¹⁸. Según datos nutricionales de la pitahaya puede contener entre 4 y 25 mg de ácido ascórbico por cada 100 g de pulpa dependiendo la especie.⁹

4.7.3. Determinación de la cantidad apreciable de sustancias básicas

- Pesar 10 gramos de la pulpa del fruto en una balanza, posteriormente medir en una probeta 100 mL de la solución para extracción A (ácido meta fosfórico - ácido acético). Colocar la muestra en un mortero, agregar cantidad suficiente de la solución para extracción A, triturar la muestra continuamente hasta obtener una solución.

- Medir el pH colocando una gota del indicador de pH azul de timol al mortero o utilizando un vidrio reloj. Intervalo de transición de pH 1,2 - 2,8 cambia de color de rojo a amarillo y de pH 9,0 - 13,0 cambia de color de azul a rosado. Si el resultado de la prueba da un pH ácido no se corrige el pH, caso contrario si la prueba da un pH básico se tendría que hacer una corrección del pH en el momento de la extracción.

4.7.4. Extracción y preparación de la solución de ensayo

- Pesar 50 gramos de pulpa de la fruta (puede variar según especie que se esté analizando), la pulpa se tritulará en un mortero para extraer el zumo, agregar una pequeña cantidad de la solución para extracción A o B según sea el caso, tritular la muestra continuamente hasta obtener una solución.

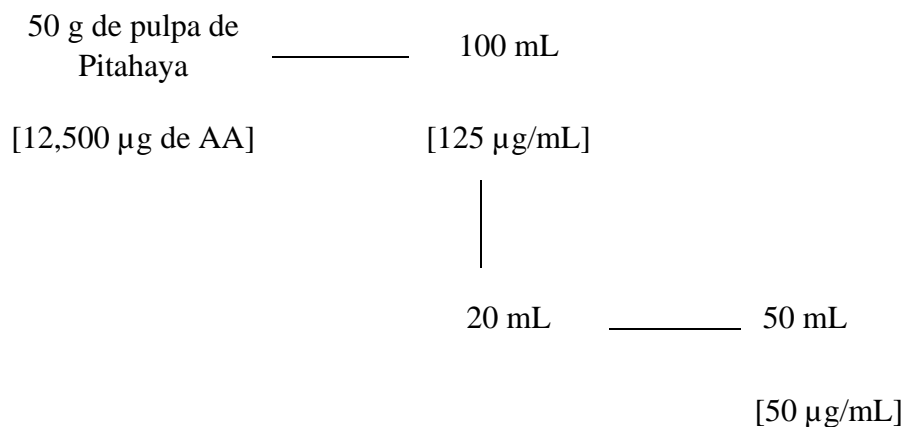
- Caso 1: Si hay cantidades apreciables de sustancias básicas ajustar el pH con la solución de extracción B (ácido metafosfórico - ácido acético - ácido sulfúrico), ajustar el pH hasta aproximadamente 1,2 (se continúa diluyendo con la solución de extracción A).

- Caso 2: Si no hay cantidades apreciables de sustancias básicas solo hacer uso de la solución de extracción A (ácido metafosfórico - ácido acético).

- La solución obtenida se pasa a un beaker de 100 mL cuidando que no queden restos en el mortero, con la ayuda de un agitador magnético agitar aproximadamente por 5 minutos agregando constantemente la solución de extracción A (tomar en cuenta que se llevará el aforo a 100 mL).

- Colar la solución obtenida con la ayuda de un colador de acero inoxidable, hacer al menos unos tres colados, agitar de 2-3 minutos en cada colado. Finalmente, en un balón volumétrico de 100 mL filtrar la solución a través de papel Whatman No. 12 y aforar con la solución de extracción A. Nombrar a esta solución madre de ensayo (teóricamente 1 gramo de pulpa contiene 250 µg de ácido ascórbico; puede variar entre especies).

- Solución 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$: Tomar 20 mL de la solución madre agregarla a un balón volumétrico de 50 mL y llevar a volumen con la solución de extracción A.



4.7.5. Preparación de soluciones previo a determinación en el fluorómetro

- Solución muestra: En un matraz erlenmeyer de 25 mL, transferir 10 mL de la solución preparada anteriormente (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), agregar 5 mL de NBS al 0.5% agitar con ayuda del agitador magnético, filtrar a través de papel Whatman No. 12 y desechar los primeros mL.

-En un balón volumétrico de 100 mL previamente rotulado (Mx), agregar 5 mL de solución de acetato de sodio 50%. Luego transferir 5 mL del filtrado anterior, agitar y diluir a volumen con agua.

-Soluciones estándar: Preparar 5 matraces erlenmeyer de 25 mL, transferir 10 mL de las soluciones estándares preparadas con anterioridad (100 μg , 80 μg , 60 μg , 40 μg y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a cada erlenmeyer, agregar 5 mL de NBS al 0.5% agitar con ayuda del agitador magnético, filtrar a través de papel Whatman No. 12 y desechar los primeros mL.

-Preparar 5 balones volumétricos de 100 mL y rotular (S100, S80, S60, S40 y S20), agregarle 5 mL de solución de acetato de sodio 50% a cada balón. Luego transferir 5 mL de cada filtrado obtenido anteriormente a cada balón según corresponda la concentración, agitar y diluir a volumen con agua.

4.7.6. Preparación de soluciones blanco

- Solución muestra blanco: Rotular 1 balón volumétrico de 100 mL (Mb) agregar 5 mL de solución de ácido bórico - acetato de sodio. Luego agregar 5 mL del filtrado hecho con NBS 0.5 % y dejar reposar unos 15 minutos agitando ocasionalmente. Pasado el tiempo de reposo diluir a volumen con agua.

- Solución estándar blanco: Rotular 5 balones volumétricos de 100 mL (Sb100, Sb80, Sb60, Sb40 y Sb20), a cada balón agregar 5 mL de solución de ácido bórico - acetato de sodio. Luego agregar 5 mL del filtrado hecho con NBS 0.5 % a cada balón según corresponda la concentración y dejarlos reposar unos 15 minutos agitando ocasionalmente. Pasado el tiempo de reposo diluir a volumen con agua.

4.7.7. Determinación de la curva de calibración

- Solución estándar: Preparar 5 tubos de ensayo y rotularlos para cada concentración (100 µg, 80 µg, 60 µg, 40 µg y 20 µg/mL). De las soluciones estándar preparadas en el punto 4.7.5 contenidas en los 5 balones rotulados como (S100, S80, S60, S40 y S20) tomar 2 mL de cada solución y transferirla a su respectivo tubo. Utilizando una pipeta agregue 5 mL de solución O-fenilenediamina y agite los tubos en un vortex, déjelos reposando durante 35 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Transfiera las soluciones a los tubos de lectura de fluorescencia y mida su intensidad en el fluorómetro a una longitud de onda entre 430 nm que es de máxima emisión.

- Solución estándar blanco: Preparar 5 tubos de ensayo y rotularlos como estándar blanco de cada concentración (100 μg , 80 μg , 60 μg , 40 μg y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). De las soluciones estándar preparadas en el punto 4.7.6 contenidas en los 5 balones rotulados como (Sb100, Sb80, Sb60, Sb40 y Sb20) tomar 2 mL de cada solución y transferirla a su respectivo tubo. Utilizando una pipeta agregue 5 mL de solución O-fenilenediamina y agite los tubos en un vortex, déjelos reposando durante 35 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Transfiera las soluciones a los tubos de lectura de fluorescencia y mida su intensidad en el fluorómetro a una longitud de onda entre 430 nm que es de máxima emisión.

-Registrar los valores de la intensidad de fluorescencia en la Tabla N^o3 y corregir dichas intensidades. Construir la gráfica de calibración, ubicando en el eje “X” la concentración de ácido ascórbico en micro-gramos y en el eje “Y” la intensidad relativa de fluorescencia corregida, como se muestra a continuación.

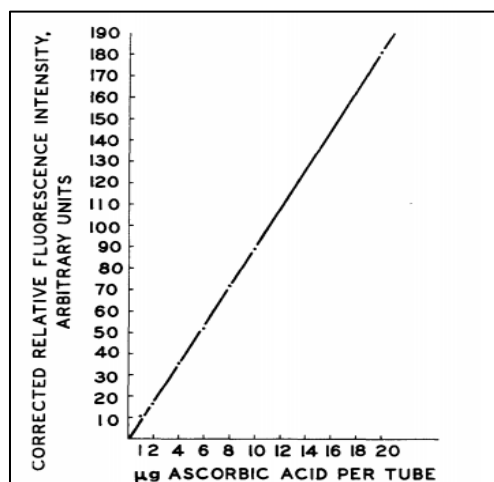


Figura N^o7. Fluorescencia vs μg de ácido ascórbico.¹⁶

4.7.8. Determinación de fluorescencia de la muestra

- Determinación de la muestra: Preparar un tubo de ensayo y rotularlo. De la solución muestra preparada en el punto 4.7.5 contenida en el balón rotulado como (Mx) transferir 2 mL al tubo de ensayo. Utilizando una pipeta agregue 5 mL de solución O-fenilenediamina y agite el tubo en un

vortex, déjelo reposando durante 35 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Transfiera la solución al tubo de lectura de fluorescencia y mida su intensidad en el fluorómetro a una longitud de onda entre 430 nm que es de máxima emisión.

- Determinación de la muestra blanco: Preparar un tubo de ensayo y rotularlo. De la solución muestra preparada en el punto 4.7.5 contenida en el balón rotulado como (Mb) transferir 2 mL al tubo de ensayo. Utilizando una pipeta agregue 5 mL de solución O-fenilenediamina y agite el tubo en un vortex, déjelo reposando durante 35 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Transfiera la solución al tubo de lectura de fluorescencia y mida su intensidad en el fluorómetro a una longitud de onda entre 430 nm que es de máxima emisión.

-Registrar los valores de la intensidad de fluorescencia en la Tabla N°3 y corregir dicha intensidad.

4.8. Cálculos involucrados:

- Construir una tabla para realizar la anotación de los datos obtenidos como la siguiente:

Tabla N°3. Datos obtenidos del análisis del estándar y muestra

Resultados			
Concentración µg / mL	Intensidad de fluorescencia	Intensidad de fluorescencia del blanco	Intensidad de fluorescencia corregida
100			
80			
60			
40			
20			
Muestra			

Fuente: Elaboración propia

- En la figura N^o7 se observa la curva de calibración. La ecuación que define la curva de calibración para este análisis se establece como $y = mx$

Donde:

y = la intensidad de la fluorescencia

m = pendiente de la recta

x = concentración de ácido ascórbico en $\mu\text{g/mL}$

- Para encontrar x de la muestra analizada (aproximadamente de $50 \mu\text{g/mL}$) se despeja de la ecuación anterior y se ajusta de la siguiente manera para encontrar los micro-gramos de ácido ascórbico en 100 g de pulpa.

$$\text{Ácido ascórbico } \mu\text{g} / 100 \text{ g} = [(\text{Intensidad de fluorescencia} / m) * \text{FD} * 100] / \text{peso muestra (g)}$$

$$\text{FD} = \text{Volumen de aforo} / \text{Volumen de alícuotas}$$

$$\text{Para este caso el FD} = (100 * 50 * 100) / (5 * 20) = 5,000$$

$$\text{Peso de muestra} = 50 \text{ gramos}$$

- Alternativa propuesta por la AOAC: La siguiente fórmula es una alternativa para calcular los micro-gramos de ácido ascórbico, en este caso solo se prepara una solución estándar y muestra con sus respectivos blancos, teniendo en cuenta que ambas deben tener aproximadamente la misma concentración.

$$\text{Ácido ascórbico mg} / \text{gramo} = [(\text{Av.C} - \text{Av. D}) / (\text{Av. A} - \text{Av.B})] * (\text{FD} * \text{S} * \text{V/E})$$

- Convertir el resultado a microgramos por cada 100 gramos de pulpa, utilizar el factor de conversión $1 \text{ mg} = 1000 \text{ } \mu\text{g}$. Esto con el fin de comparar el resultado con los reportados en la tabla N° 2.

Dónde:

Av.C = Fluorescencia de la muestra

Av.D = Fluorescencia de la muestra en blanco

Av.A = Fluorescencia del estándar

Av.B = Fluorescencia del estándar en blanco

FD = Factor de dilución

S = concentración del estándar en mg/mL añadido al tubo de lectura

V = volumen de la solución de ensayo inicial

E = Número de gramos o mL.

4.9. Normativas nacionales o internacionales:

- Se hizo revisión de la norma salvadoreña (Directrices del Codex Alimentarius y de la norma Codex Stan 237-203) sobre la pitahaya y no se encontró ningún valor de referencia para comparar, sin embargo, en el estudio “Pitahaya (*Hylocereus spp.*): Cultivo, características fisicoquímicas, composición nutricional y compuestos bioactivos”⁹ se encuentra una tabla de referencia de las especies más comunes comercialmente, donde la especie con pulpa blanca y piel rosa contiene $25 \text{ } \mu\text{g} / 100 \text{ gramos}$ de pulpa y la especie con pulpa blanca y piel amarilla contiene $4 \text{ } \mu\text{g} / 100 \text{ gramos}$ de pulpa.

CAPITULO V

5.0. CONCLUSIONES

- 1- El método fluorométrico se fundamenta en que la determinación de ácido ascórbico requiere su oxidación a ácido dehidroascórbico (ADA) luego se añade O-fenilenediamina (PDA) (marcador fluorogénico) a la solución de muestra para producir un derivado de quinoxalina fluorescente. Siendo el método Fluorométrico más sensible y selectivo para la determinación de ácido ascórbico en este tipo de muestras coloreadas obtenidas de la pitahaya, lo que lo hace superior frente a otros métodos volumétricos o espectrofotométricos que presentan interferencias de color.
- 2- El pre-tratamiento de las muestras es esencial para evitar la oxidación del ácido ascórbico, lo que permite asegurar la integridad del compuesto durante el proceso de análisis. La utilización de ácido metafosfórico y ácido acético en la extracción es efectivo para estabilizar el ácido ascórbico y evitar su degradación. Además, puede aplicarse a todas las especies e incluso a otros tipos de matriz.
- 3- Se definió el procedimiento de preparación de muestra y estándar según metodología propuesta por la AOAC con ciertas modificaciones de otros estudios, con el fin de medir la intensidad fluorométrica del ácido ascórbico para establecer la curva de calibración, que permite interpolar para encontrar la cantidad de ácido ascórbico en la muestra.
- 4- La fórmula propuesta por la AOAC resultó ser de mucha utilidad, pues nos permite calcular los micro-gramos en 100 gramos de pulpa en un solo paso. Además, nos permite comparar en las mismas unidades, la cantidad teórica reportada en las tablas nutricionales de la pitahaya.

- 5- La aplicación del método fluorométrico no solo es relevante para asegurar el valor nutricional de alimentos, sino también para su uso en la industria alimenticia y otras industrias como la farmacéutica, permitiendo garantizar que los productos comercializados contengan las cantidades correctas de ácido ascórbico.

- 6- El método adecuado para el análisis de ácido ascórbico dependerá siempre del tipo de muestra, el tiempo disponible, los recursos económicos con los que se disponga y la sensibilidad que se necesite para dicha muestra. Siendo el método Fluorométrico más sensible y selectivo para estas muestras coloreadas.

CAPITULO VI

6.0. RECOMENDACIONES

- 1- A los investigadores y estudiantes emplear otras soluciones para la maceración, extracción y estabilización del ácido ascórbico o utilizar un método para la extracción, como el propuesto por Sandoval A y Guartatanga C, que consiste en la maceración de la muestra con una solución de etanol al 80%
- 2- A los investigadores y estudiantes emplear otros reactivos que han demostrado ser muy buenos para la oxidación completa del ácido ascórbico y que además no presentan interferencias en el análisis, tales como el carbón activado, yodo, azul de metileno o el 2,6 diclorofenolindofenol.
- 3- A los Investigadores proponer diferentes técnicas como HPLC o valoraciones REDOX, con el fin de realizar una comparación en los análisis para la determinación de ácido ascórbico en pitahaya.
- 4- A los organismos normativos o reguladores (Sistema Nacional de Control de Alimentos) establecer una referencia de la concentración de ácido ascórbico en pitahaya, en un rango de valores que se pueda normalizar a nivel nacional.
- 5- A los estudiantes buscar en diferentes estudios la concentración de ácido ascórbico de las diferentes especies de pitahaya, con el fin de obtener varios valores que se puedan plasmar en una tabla de comparación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- Práctica 6 [2016.08.05] Lab alimentaria - vitamina c [internet] [citado 30 de agosto de 2024] disponible en: <https://es.slideshare.net/slideshow/prctica-6-20160805-lab-alimentaria-vitamina-c/67613255>.

2-Sandoval S. Cuantificación de Ácido ascórbico (vitamina C) en néctares de melocotón y manzana comercializados en supermercados de la ciudad capital [internet] Facultad de ciencias químicas y farmacia Universidad de San Carlos de Guatemala 05-2010 Disponible en: <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/tesis/QF1131.pdf>

3-World Health Organization. Vitamin and mineral requirements in human nutrition, 2nd edition. [citado 25 mayo de 2024]. disponible en: <https://www.who.int/publications/item/9241546123>.

4-Villagrán M. Muñoz M. Díaz F. Troncoso C. Morales C. Mardones L. Una mirada actual de la vitamina C en salud y enfermedad. [Departamento de Ciencia Básicas, Facultad de Medicina]. Universidad Católica de la Santísima Concepción, Concepción. Chile. 2019. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182019000600800>.

5-Teodelinda C. Lucila T. Contenido de ácido ascórbico en zumo de naranja (citrus sinensis) embotellado expandido de forma ambulatoria en relación al recién exprimido en lima - 2018 [internet]. [facultad de farmacia y bioquímica escuela académico profesional de farmacia y bioquímica]: Universidad Norbert Wiener; 2018. Disponible en: <https://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13053/2563/TESIS%20Saucedo%20Teodolinda%20-%20Torpoco%20Lucila.pdf?sequence=5>.

6-Ramos M, Belloso S. Cuantificación de ácido ascórbico en miel de abeja producida en cinco localidades de El Salvador por método redox. Mayo 2022 [internet] consultado: 31-08-24 disponible en: <https://repositorio.ues.edu.sv/server/api/core/bitstreams/55624332-a21d-4141-ab70-38423a2a4e44/content>

7-Martínez P. Elaboración de una guía para el cultivo de pitahaya (*Hylocereus andatus*) con visión agroecológica. [Facultad de ciencias agronómicas, Universidad de El Salvador]. Diciembre 2021 [internet] consultado: 31-08-24 disponible en: <https://oldri.ues.edu.sv/id/eprint/27155/1/13101757.pdf>.

8-Guartatanga C. Determinación de la capacidad antioxidante del extracto etanólico y acuoso de la pulpa del fruto de pitahaya (*Cereus sp.*) producida en la provincia de Morona Santiago para posible uso en la industria alimentaria. Universidad politecnica Salesiana. Ecuador 2022. [internet] consultado: 31-08-2024 disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/21629/1/UPS-CT009503.pdf>.

9-Verona A. Urcia J. Paucar L. Pitahaya (*Hylocereus spp.*): Cultivo, características fisicoquímicas, composición nutricional y compuestos bioactivos. Facultad de ciencias agropecuarias Universidad Nacional de Trujillo. Review 2020 [internet] consultado: 03-09-24 disponible en: <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.16>.

10-United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 43-NF 38). The United States pharmacopeia Convention 2020.

11-Limachi N. Optimización del método fluorométrico para la cuantificación de aflatoxina totales (B1, B2, G1 Y G2) en Castaña. Universidad mayor de San Andrés. Bolivia 2021. [citado el 20 de Julio 2024]. Disponible en: <https://repositorio.umsa.bo/x/mlui/bitstream/handle/123456789/26014/TE-2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

12-Fang Z. Métodos analíticos para la determinación de vitamina c en alimentos [internet]. [facultad de farmacia]: Universidad Complutense; 2007. Disponible en: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ZHONGWEI%20FANG.pdf>

13-Montoya L. Evaluación de la concentración de ácido ascórbico en cocona (*Solanum sessiliflorum* dunal), por fotometría [Internet]. Facultad de ingeniería y ciencias agrarias escuela profesional de ingeniería agroindustrial: Universidad Nacional “Toribio Rodríguez de Mendoza” De Amazonas. Consultado el 18 / 03 /2016. Disponible en: <https://repositorio.untrm.edu.pe/handle/20.500.14077/762>

14-Ayala A. Comparación de técnicas instrumentales para la determinación de Vitamina C en frutas cítricas. Revista científica. [Internet]. 2021. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.52109/cyp2021219>.

15-Fao.org. Norma para la Pitahaya [citado el 22 de junio de 2024]. Disponible en: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/shproxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.or%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B2372003%252FCXS_237s.pdf.

16-Deutsch MJ, Weeks CE. Microfluorometry assay for vitamin C. Journal of AOAC international [Internet]. 1965 [citado el 19 de julio de 2024]; Disponible en: <https://academic.oup.com/jaoac/article-abstract/48/6/1248/5729793>.

17-Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 21th ed. Gaithersburg MD: 2019.

18-Roy RB, Conetta A, Salpeter J. Automated fluorometric method for the determination of total vitamin C in food products. J Assoc Off Anal Chem [Internet]. 1976 [citado el 15 de mayo de 2024]; Disponible en: <https://academic.oup.com/jaoac/articleabstract/59/6/1244/5710627?redirectedFrom=fulltext>.

19-Cámara D, Olortegui T. Determinación de ácido ascórbico por titulación visual con 2,6 diclorofenolindofenol [internet] Facultad de industrias alimentarias, Universidad Agraria la Molina Lima-Perú 2015, consultado: 02-09-24, disponible en: https://www.academia.edu/30220568/_Universidad_Nacional_Agraria_la_Molina_Informe_N_11_Determinaci%C3%B3n_de_%C3%81cido_Asc%C3%B3rbico_por_titulaci%C3%B3n_visual_con_2_6_diclorofenolindofenol_Integrantes.

20-Sandoval A. Revisión sistemática de métodos de extracción y cuantificación de ácido ascórbico para su aplicación en frutos arazá (*Eugenia Stipitata Mc Vaugh*) y cocona (*Solanum Sessiliflorum Dunal*). corporación tecnológica de Bogotá; Disponible en: <https://repository.udca.edu.co/server/api/core/bitstreams/cc5a9ded-9160-4390-a59ecee30516e87/content>.

ANEXOS

ANEXOS N° 1

NORMA PARA LA PITAHAYA

(CODEX STAN 237-2003)

1. DEFINICIÓN DEL PRODUCTO

Esta Norma se aplica a las especies y variedades comerciales de pitahayas obtenidas de los géneros *Selenicereus* e *Hylocereus*, de la familia Cactaceae, que habrán de suministrarse frescas al consumidor, después de su acondicionamiento y envasado. Se excluyen las pitahayas destinadas a la elaboración industrial.

2. DISPOSICIONES RELATIVAS A LA CALIDAD

2.1 REQUISITOS MÍNIMOS

En todas las categorías, a reserva de las disposiciones especiales para cada categoría y las tolerancias permitidas, las pitahayas deberán:

- Estar enteras.
- Estar sanas, deberán excluirse los productos afectados por podredumbre o deterioro que hagan que no sean aptos para el consumo.
- Estar limpias, y exentas de cualquier materia extraña visible.
- Estar prácticamente exentas de plagas que afecten al aspecto general del producto.
- Estar prácticamente exentas de daños causados por plagas.

- Estar exentas de humedad externa anormal, salvo la condensación consiguiente a su remoción de una cámara frigorífica.
- Estar exentas de cualquier olor y/o sabor extraños.
- Ser de consistencia firme.
- Tener un aspecto fresco.
- Estar exentas de rajaduras en la corteza.
- Estar dotadas de un pedúnculo o tallo con una longitud comprendida entre los 15 y 25 mm.
- Estar sin espinas.

2.1.1 Las pitahayas deberán haber alcanzado un grado apropiado de desarrollo y madurez, teniendo en cuenta las características de la variedad y/o tipo comercial y la zona en que se producen. El desarrollo y condición de las pitahayas deberán ser tales que les permitan:

- Soportar el transporte y la manipulación.
- Llegar en estado satisfactorio al lugar de destino.

ANEXOS N° 2

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Solución de extracción ácido metafosfórico - ácido acético (A): Disolver con Agitación 30 g de HPO_3 en 80 mL de ácido acético glacial y aproximadamente 500 mL de H_2O y diluir a 1 L.

Solución de extracción ácido metafosfórico - ácido acético - ácido sulfúrico (B): Proceder como la solución anterior, excepto que se utiliza H_2SO_4 0.3 N en lugar de H_2O .

Azul de timol (indicador de pH): Disolver 0.1 g del indicador, triturando en un mortero con 10.75 mL de NaOH 0.02 N y diluir hasta 250 mL con H_2O .

N- Bromosuccinimida 0.5% (NBS): Disolver 5 gramos de NBS en 1 L de H_2O .

Solución de acetato de sodio 50 %: Disolver 500 g de $\text{NaOAc} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ en agua y diluir a 1 L.

Solución de ácido bórico - acetato de sodio: Disolver 3 g de H_3BO_3 en 100 mL de solución de acetato de sodio.

Solución de O-fenilenediamina: Pesar 20 g de O-fenilenediamina di-hidrocloruro por cada 100 mL de solución, diluir inmediatamente antes de usar.